

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-192163

(43)Date of publication of application : 03.08.1993

(51)Int.Cl.

C12N 15/53

C12N 1/21

**C12N 9/04**

// (C12N 15/53

C12R 1:125 )

(C12N 1/21

C12R 1:19 )

(21)Application number : 03-252073

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 30.09.1991

(72)Inventor : FUJITA TAITARO

**(54) INOSITOL DEHYDROGENASE GENE**

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To massively obtain the subject gene at a low cost by culturing a host cell transformed with a specific vector.

**CONSTITUTION:** *Bacillus subtilis* [AI] strain is extracted and separated to obtain (A) an inositol dehydrogenase gene having the formula or the substantially biologically same base sequence as the sequence of the formula. Subsequently, (B) a vector consisting of a plasmid pIOL05d15 containing the component A is obtained. A host, *Escherichia coli*, is transformed with the component B to obtain (C) *Escherichia coli* MV 1184 strain (FERM P-12531). The strain C is cultured in a medium containing a carbon source, a nitrogen source, etc., by an aeration culture method, etc., and (D) the cells are separated from the obtained culture product. The cells D is lysed and subsequently purified with a chromatograph such as Ultragel AcA-34 to provide the inositol dehydrogenase.

[illegible]

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

**BEST AVAILABLE COPY**

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-192163

(43)公開日 平成5年(1993)8月3日

|                          |       |         |                           |        |
|--------------------------|-------|---------|---------------------------|--------|
| (51)Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I                       | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 15/53            | Z N A |         |                           |        |
| 1/21                     |       | 7236-4B |                           |        |
| 9/04                     | Z     | 7823-4B |                           |        |
| // (C 1 2 N 15/53        |       | 8931-4B | C 1 2 N 15/ 00            | A      |
|                          |       |         | 審査請求 未請求 請求項の数 7 (全 18 頁) | 最終頁に続く |

(21)出願番号 特願平3-252073

(22)出願日 平成3年(1991)9月30日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年3月31日  
社団法人日本農芸化学会開催の「日本農芸化学会1991年  
度大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 藤田 泰太郎

広島県福山市神村町6241番地の17

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54)【発明の名称】 イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子

(57)【要約】

\*生産する手段を提供する。

【目的】 微生物由来のイノシトールデヒドロゲナーゼ

【構成】 下記式：

遺伝子の構造を明らかにし、当該酵素を安価かつ大量に\*

```
ATGAGTTTACGTATTGGCGTAATTGGAAGTGGAGCAATCGGAAAAGAACATATTAACCGTATCAGAACAAAG
CTGTCAGGCGCGGAAATTGTAGCTGTAACGGATGTTAATCAAGAAGCTGCACAAAAGGTCGTTGAGCAATAC
CAATTAACGCGACGGTTTATCCGAATGATGACAGCTTGCTTGACAGACGAAAATGTAGACGCTGTTTATAGTG
ACAAGCTGGGGGCTGCGCATGAGTCAAGCGTGCTGAAAGCGATTAAAGCCCAGAAATATGTGTTCTGTGAA
AAACCGCTCGGACAACGGCTGAAGGATGCATGCGCATTGTGGAAGAAGAAATCAAAGTGGGCAAACGCTT
GTTCAAGTCGGCTTCATGCGCCGTTATGACAGCGGTTACGTACAGCTGAAAGAAGCGCTCGATAATCATGTC
AACGGCGAGCCTCTTATGATTCACTGCGCGCACCGCAACCCGACTGTAGGAGATACTATACAACGGATATG
GCTGTAGTCGACACGCTTGTTTCATGAAATTGACGTGCTCCACTGGCTCGTCAATGATGACTACGAGTCCGTT
CAAGTCATCTATCCGAAAAATCAAAAAACGCGCTTCCACATTTAAAGATCCGAAATCGTCGTGATTGAA
ACAAAAGCGGTATCGTCATCAATGCTGAAATCTATGTGAATGTAATACGGCTATGACATTCATGTGAA
ATCGTCGGAGAAGACGGCATCAAGCTTCCCGAGCCATCAAGCATCAGCTTGAGAAAAGAAGGCAGATTC
AGCACTGATATTTTGATGGATTGGCAGAGACGCTTTGTCGCTGCGTATGATGTGGAATCCAAGACTTTATT
GATTCCGATTCAAAAGAAGGCGAGGTGAGCGGACCGACGGCATGGGACGGCTATATTGCTGCTGCAGACT
GACGCGTGCTAAAAGCCCAGGAATCTGGACAAAAGAAAGGTTGAATTGAAGGAAAACCGGAATTCTAT
CAATCTTTTACAACAGTTCAAACTAA
```

で表されるイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子または

これと実質的に生物学的に同等な遺伝子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バシラス・サチルス (*Bacillus subtilis*)

s) に属する微生物由来のイノシトールデヒドロゲナーゼ \*

\* ゼ遺伝子またはそれと実質的に生物学的に同等なイノシトールデヒドロゲナーゼ活性をコードする遺伝子。

【請求項2】 下記式(1):

MSLRIGVIGTGAIGKEHINRITNKLSGAEIVAVTDVNDQEAQKVVEQVQLNATVYPNDSSLADENVDAVLV  
 TSWGPAHESSVLKAIKAQKYVFCEKPLATTAEGCMRIVEEEIKVGKRLVQVGFMRRYDSGYVQLKEALDNHV  
 NGEPLMIHCAHRNPTVGDNYTTDMAVVDLTVHEIDVLHVLVNDVYESVQVIYPKSKNALPHLKDPQIVVIE  
 TKGIVINAEIYVNCYGYDIQCEIVGEDGIKLEPSSISLRKEGRFSTDILMDWQRRFVAAYDVEIQDFI  
 DSIQKKGEVSGPTAWDGYIAAVTTDACVKAQESQKEKVELKEPEFYQSFTTVQN

(1)

(式中のアルファベットは、以下のアミノ酸を示す:

A;アラニン、C;システイン、D;アスパラギン酸、  
 E;グルタミン酸、F;フェニルアラニン、G;グリシン、  
 H;ヒスチジン、I;イソロイシン、K;リシン、  
 L;ロイシン、M;メチオニン、N;アスパラギン、  
 P;プロリン、Q;グルタミン、R;アルギニン、S;  
 セリン、T;スレオニン、V;バリン、W;トリプトファン、  
 Y;チロシン)で表されるアミノ酸配列、または※

10※それと実質的に生物学的に同等なアミノ酸配列を有する、イノシトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項3】 請求項2記載の式(1)で表されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に生物学的に同等なアミノ酸配列を有するイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項4】 下記式(II):

ATGAGTTTACGTATTGGCGTAATTGGAAGCTGGAGCAATCGGAAAAGAACATATTAACCGTATCAGCAACAAG  
 CTGTACAGCGCGGAAATTTAGCTGTAACGGATGTTAATCAAGAAGCTGCACAAAAGTCGTGAGCAATAC  
 CAATTAACACGCGACGGTTTATCCGAATGATGACAGCTTGCTTGCAGACGAAAAATGAGACGCTGTTTATG  
 ACAAGCTGGGGCCTGCGCATGAGTCAAGCGTGCTGAAAGCGATTAAAGCCCAGAAATATGTGTTCTGTGAA  
 AAACCGCTCGGACACCGCTGAAGGATGCATGCGCATTGTGGAAGAAGAAATCAAAGTGGGCAACGCGCTT  
 GTTCAAGTCCGCTTCATGCGCGCTTATGACAGCGTTACGTACAGCTGAAAGAAGCGCTCGATAATCATGTC  
 AACGCGGAGCCTCTTATGATTCACTGCGCGCACCGCAACCGACTGTAGGAGATAACTATACACGGATATG  
 CCTGTAGTCGACAGCTTGTTCATGAAATGACGTGCTCCACTGGCTCGTCAATGATGACTACGAGTCCGTT  
 CAAGTCATCTATCCGAAAAATCAAAAAACGCGCTTCCACATTTAAAGATCCGCAATCGTCGTGATTGAA  
 ACAAAGGCGGTATCGTCATCAATGCTGAAATCTATGAACTGTAATACGGCTATGACATTCAATGTGAA  
 ATCGTCGGAGAAGACGGCATCATCAAGCTTCCCGAGCCATCAAGCATCAGCTTGAGAAAAGAGGCAGATT  
 AGCACTGATATTTGATGGATTGGCAGAGCGCTTTGCTGCTGCTATGATGTGGAATCCAGACTTTATT  
 GATTGATTCAAAAAGAAAGCGAGGTGAGCGACCGACCGCATGGGACGGCTATATTGCTGCTGACCGACT  
 GACGCGTGTGTAAGAGCCAGGAATCTGGACAAAAGAAAAGTTGAATTGAAGAAAACCGGAATTCTAT  
 CAATCTTTTACAACAGTTCAAAACTAA

(II)

で表される塩基配列、またはそれと実質的に生物学的に同等な塩基配列を有するイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子。

【請求項5】 請求項3または4に記載のイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子、または該遺伝子と実質的に生物学的に同等な遺伝子を有する組換えベクター。

【請求項6】 請求項5記載の組換えベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項7】 請求項6記載の宿主細胞を培養し、その細胞体内または培養液からイノシトールデヒドロゲナーゼ活性物質を回収することを特徴とするイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、バシラス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来のイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子およびその遺伝子が組み込まれた組換えベ

クターならびにその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】 ミオイノシトールはビタミンB群の一種として成長促進、脂肪肝、および肝硬変の予防、動脈硬化の予防作用があり、総合ビタミン剤、肝臓強化剤、老化防止剤などの医薬に広く用いられている。また、その誘導体であるイノシトールヘキサニコチネートが末梢血管拡張剤として使用されるなど有用な物質である。このように広く用いられているイノシトールの定量には、イノシトールデヒドロゲナーゼが用いられ、即ち、イノシトールデヒドロゲナーゼによる脱水素反応に際して還元されるNAD<sup>+</sup>を測定することによりイノシトールが定量される。イノシトールデヒドロゲナーゼはまた、イノシトールを結合したマルトオリゴ糖を基質としたα-アミラーゼの活性測定法にも利用されている(特開昭63-196300)。

【0003】 このイノシトールデヒドロゲナーゼはミオ

50

ーイノシトール窒化能を有する微生物（例えばエンテロバクター・アエロゲネス [バーマン・ティー, マガサニック・ビー, ジェイ・ビー・シー (Barman, T. and Magasanik, B., Journal of Biological Chemistry) 241, 800-806 (1966)]、バシラス・サチルス [ラマレイ・アール, フジタ・ワイおよびフリーズ・イー, ジェイ・ビー・シー (Ramaley, R., Fujita, Y. and Freese, E., The Journal of Biological Chemistry), 254 (16), 7684-7690 (1979)]）、酵母（例えばクリプトコッカス・メリビオサム [ビダルーレイリア・エム, バン ユーデン・エヌ, バイオケム・パイオフィズ・アクタ (Vidal-Leiria, M., Van Uden, N., Biochemica et Biophysica Acta) 293, 295-303 (1973)]、クレブジラ・ニューモニエ, セラチア・マセッセンズ）、動物の器官（例えば脳 [ヒップス・ピー・ピー, イブランド・エム・アール, バイオケム・パイオフィズ・リス・コミュニ (Biochemical and Biophysical Research Communication), 68, 1133-1138, (1976)]、精子）に存在しており、現在、エンテロバクター・アエロゲネスから精製された酵素が市販されている。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、イノシトールデヒドロゲナーゼは細胞内酵素であり、かつ細胞中での存在量が極めて微量であるため、その精製に複雑な工程を必要とするうえ、大量生産が困難であるという問題がある。また、いずれの由来のイノシトールデヒド

```
MSLRIGVIGTGAIGKEHINRITNKLSGAEIVAVTDVNQEAQKVVEQYQLNATVYPNDSSLADENVDAVLV
TSWGPAAHESVYLKAIKAQKYVFCCKPLATTAEGCMRIVEEEIKVGKRLVQVGMRRYDSGYVQLKEALDNHV
NGEPLMIHCAHRNPTVGDNYTTDMAVVDTLVHEIDVLHVLVNDYVESVQVIYPKSKNALPHLKDPQIVVIE
TKGGIVINAEIYVNCYGYDIQCEIVGEDGIKLEPSSISLRKEGRFSTDILMDWQRRFVAAYDVEIQDFI
DSIQKKGEVSGPTAWDGYIAAVTTDACVKAQESQKKEKVELKEPEFYQSFTTVQN
```

#### (1)

(式中のアルファベットは、以下のアミノ酸を示す：  
A；アラニン、C；システイン、D；アスパラギン酸、  
E；グルタミン酸、F；フェニルアラニン、G；グリシン、  
H；ヒスチジン、I；イソロイシン、K；リシン、  
L；ロイシン、M；メチオニン、N；アスパラギン、  
P；プロリン、Q；グルタミン、R；アルギニン、S；  
セリン、T；スレオニン、V；バリン、W；トリプトファン、  
Y；チロシン）；

(2) 式 (1) で表されるアミノ酸配列、またはそれと※

```
ATGAGTTTACGTATTGGCGTAATTGGAACCTGGAGCAATCGGAAAAGAACATATTAACCGTATCAGCAACAAG
CTGTCAGGCGCGGAAATTGTAGCTGTAACGGATGTTAATCAAGAAGCTGCACAAAAGGTCGTTGAGCAATAC
CAATTAACGCGACGGTTTATCCGAATGATGACAGCTTGCTTGACAGCAAAAATGTAGACGCTGTTTTAGTG
ACAAGCTGGGGGCTGCGCATGAGTCAAGCGTGCTGAAAGCGATTAAAGCCAGAAATATGTGTTCTGTGAA
AAACCGCTCGGACAACGGCTGAAGGATGCATGCGCATTGTCGAAGAAGAAATCAAAGTGGGCAACCGCCTT
GTTCAAGTCCGCTTCATGCGCCGTTATGACAGCGGTACGTACAGCTGAAAGAAGCGCTCGATAATCATGTC
AACGGGAGCCTCTTATGATTCACTGCGCGCACCGCAACCGGACTGTAGGAGATAACTATACAACGGATATG
GCTGTAGTCGACAGCTTGTTTCATGAAATTGACGTGCTCCACTGGCTCGTCAATGATGACTACGAGTCCGTT
```

\* ログナーゼにおいてもその遺伝子の構造が明らかにされておらず、そのため、当該酵素を安価かつ大量に生産させるべき遺伝子工学的手段を講じることができない状況にあった。

【0005】なお、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子のクローニングが困難であった一因は、通常の微生物はイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有するため、活性を指標として遺伝子をクローニングすることが困難であったためである。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これらの問題を解決すべく鋭意研究を重ねた。その結果、バシラス・サチルス由来のイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む2.4KbのDNA断片の全塩基配列を決定し、当該イノシトールデヒドロゲナーゼタンパク質の構造（アミノ酸配列）を明らかにし、本発明を完成するに至った。バシラス・サチルス由来のイノシトールデヒドロゲナーゼは、前記ラマレイ・アール等により分子量約3900のサブユニットからなることが示唆されていたが、そのアミノ酸配列あるいは遺伝子配列は知られていなかった。

【0007】すなわち、本発明は、

(1) 下記式 (I) で表されるアミノ酸配列、または式 (I) と実質的に生物学的に同等なアミノ酸配列を有するバシラス・サチルス (*Bacillus subtilis*) 由来のイノシトールデヒドロゲナーゼ；

式 (I)：

※ 実質的に生物学的に同等なアミノ酸配列を有するイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列をコードする遺伝子；

(3) 上記式 (I) のアミノ酸配列をコードし、さらにその末端に終止コドン TAA を含む下記式 (II) で表される塩基配列、またはそれと実質的に生物学的に同等な塩基配列を有する生物学的に純化されたイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子；

式 (II)：

CAAGTCATCTATCCGAAAAATCAAAAAACGCGCTTCCACATTTAAAAGATCCGCAATCGTCGTGATTGAA  
 ACAAAGGCGGTATCGTCATCAATGCTGAAATCTATGTGAACGTGAAATACGGCTATGACATTCAATGTGAA  
 ATCGTCGAGAAGACGGCATCATCAAGCTTCCCGAGCCATCAAGCATCAGCTTGAGAAAAGAAGGCAGATTC  
 AGCACTGATATTTTATGGATTGGCAGAGACGCTTTGTCGCTGCGTATGATGTGAAATCCAAGACTTTATT  
 GATTGATTCAAAAGAAAGGCGAGGTCAGCGGACCGACGGCATGGGACGGCTATATTGCTGCTGCAGCACT  
 GACGCGTGTGTAAGCCAGGAATCTGGACAAAAAGAAAGTTGAATTGAAGGAAAAACCGAATTCTAT  
 CAATCTTTTACAACAGTTCAAACTAA

(II) ;

(4) 前記(2)の遺伝子を含有する組換えベクター；  
 (5) 前記(5)の宿主細胞を培養し、その菌体ないしは培養液から酵素を回収することよりなる、バシラス・サチルス由来のイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法を提供するものである。

【0008】式(II)で表されるイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、バシラス ジェネティック ストック センターより入手できるバシラス・サチルス1A1株から、後記実施例に記載の方法にしたがって単離された。この遺伝子を含むプラスミドpIOL05d15により形質転換された大腸菌MV1184株は、*Escherichia coli* SAM1858と命名され、平成3年9月25日付で工業技術院微生物工業技術研究所に、受託番号微工研菌寄第12531号(FERM P-12531)として寄託されている。

【0009】本発明のイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、上記1A1株以外のイノシトール質化能を持つバシラス・サチルスにも存在すると思われる。そのような微生物に由来する遺伝子も後記の実施例と同様の操作を、場合により当業者に明らかな修飾を加えて実施すれば単離することができ、本発明の範囲に含まれる。さらに、式(II)の配列と実質的に生物学的に同等な塩基配列を有する遺伝子も本発明の範囲内である。例えば、一つのアミノ酸に対応するコドンおよび終止コドンは複数存在することが知られており、したがって、式(II)の配列に対応する上記式(I)のアミノ酸配列をコードする遺伝子は本発明の範囲内である。さらに、蛋白質の性質は、その一部のアミノ酸を性質の類似する他のアミノ酸に置換し、あるいは活性に影響の少ない部分に1つもしくはそれ以上のアミノ酸の削除、挿入または置換を行っても、実質的に生物学的に同等の性質を示すことが知られている。したがって、そのような修飾アミノ酸配列をコードする塩基配列も本発明の遺伝子に含まれる。

【0010】後述の実施例に示すイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、公知の方法にしたがって細菌DNAの単離、遺伝子ライブラリーの作成、スクリーニング、クローニング、ハイブリダイゼーション、サブクローニング、DNA塩基配列の決定等を行うことにより決定した。

【0011】そのようなクローニング等のため、あるいは本発明の遺伝子を用いてイノシトールデヒドロゲナーゼを生産するための宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌

等の細菌類、望ましくは大腸菌HB101、JM109、MV1184株等を用いることができ、ベクターとしてはpBR322、pUC18、pUC118、pUB110などが使用できる。プロモーターとしては、宿主細胞で機能するプロモーターであればいずれも使用可能であり、例えば宿主として大腸菌を用いる場合は、下記実施例に示すlacプロモーターが望ましい。lacプロモーターを用いた場合は、大腸菌の対数増殖期にIPTGを0.1~1mMになるように添加することにより、イノシトールデヒドロゲナーゼの発現を効果的に誘導することができる。

【0012】本発明の遺伝子を含有するプラスミドで形質転換された宿主細胞を用いてイノシトールデヒドロゲナーゼを製造するには、公知の方法にしたがって、適当な炭素源、窒素源および微量の金属元素等を含む培地中で、該細胞を通気培養することによりイノシトールデヒドロゲナーゼを含有する菌体を得ることができる。そのような培地として例えば実施例に示すLブロスが知られている。イノシトールデヒドロゲナーゼは菌体内に生産されるので、菌体から回収できる。例えば、当該イノシトールデヒドロゲナーゼを含む菌体溶解液からウルトラゲルAcA-34、DEAE-セルロース、ヒドロキシアパタイト、オメガアミノヘキシルセファロース等によるクロマトグラフィーを行うことにより、所望のイノシトールデヒドロゲナーゼの精製品が得られる。精製に関しては、ラマレイ・アール、フジタ・ワイおよびフリーズ・イー、ジェイ・ビー・シー(Ramaley, R., Fujita, Y. and Freese, E., The Journal of Biological Chemistry), 254(16), 7684(1979)に記載されている方法も利用可能である。

【0013】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0014】実施例1

遺伝子のスクリーニング

枯草菌、バシラス・サチルス(*Bacillus subtilis*) 60015株から常法により全DNAを単離した。細菌DNAの単離法としては、例えばサイトウ・ミウラ法[サイトウ・エイチおよびミウラ・ケイ、バイオケミカ・バイオフィジカ・アクタ(Saito, H. and Miura, K., Biochem. Biophys. Acta), 72, 619(1963)]

が挙げられる。このDNAを制限酵素Sau3A Iで部分分解した。このDNA断片を制限酵素BamH Iで切断したファージ $\rho$ 11とT4リガーゼで結合し、イノシトールオペロンを含む大きな部分が欠損した変異株であるバシラス・サチルス61656 ( $\Delta$ igf) [フジタ・ワイおよびフリース・イー, ジャーナル・オブ・バクテリオリジー (Fujita, Y. and Freese, E., Journal of Bacteriology, 145, 760 (1981)) [フジタ・ワイおよびフジタ・ティー, ジャーナル・オブ・バクテリオリジー (Fujita, Y. and Fujita, T., Journal of Bacteriology, 154, 864 (1983)) (バシラス ジェネティック ストック センター, オハイオ州立大学より1A465株として入手可能) の $\rho$ 11溶原菌を形質転換してイノシトール資化性の復帰したクローンを選択することにより、イノシトールオペロンがクローン化されたファージ $\rho$ 11iol'を得た。このファージ $\rho$ 11iol'を制限酵素BamH Iで切断し、制限酵素BamH Iで切断したプラスミドpBR322とT4リガーゼで結合し、大腸菌HB101を形質転換してテトラサイクリン感受性、アンピシリン耐性形質転換 20 体として $\rho$ 11由来のDNA断片およびイノシトールオ\*

\*ペロンを含むバシラス・サチルス由来のDNA断片計13Kbを含むプラスミドpIOL01を選択した。

【0015】なお上記において、バシラス・サチルス61656 ( $\Delta$ igf) 株の $\rho$ 11溶原菌の形質転換は常法、例えば河村らの方法 [カワムラ・エフ, サイトウ・エイチおよびイケダ・ワイ, ジーン (Kawamura, F. Saito, H. and Ikeda, Y., Gene) 5, 87 (1979)] を用いた。また、大腸菌の形質転換は常法、例えば、マンドル・ヒガの方法 [マンドル・エムおよびヒガ・エイ, ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol.), 53, 154 (1970)] を用いた。

【0016】第1表に示すようにバシラス・サチルス61656 ( $\Delta$ igf) 株および大腸菌HB101株はイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有さないが、ファージ $\rho$ 11iol'で溶原化したバシラス・サチルス61656 ( $\Delta$ igf) 株およびpIOL01を持つ大腸菌HB101株はイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有することから、この13Kb断片内にイノシトールデヒドロゲナーゼの遺伝子が含まれることが示された。

【0017】

第1表

バシラス・サチルスにおけるイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現

| 菌株                                     | イノシトールデヒドロゲナーゼ活性<br>(nmol/min 蛋白質mg当たり) |     |
|--|---|-----|
|  | 培地へのイノシトールの添加<br>- +                    |     |
| B. Subtilis                            |   |     |
| 60015(iol+)                            | 10                                      | 363 |
| 61656 ( $\Delta$ igf)                  | <5                                      | <5  |
| 61656 ( $\Delta$ igf) [ $\rho$ 11iol+] | 474                                     | 232 |
| E. coli                                |   |     |
| HB101                                  | <5                                      | <5  |
| HB101 [pIOL01]                         | 177                                     | 226 |

## 実施例2

### 遺伝子のサブクローニング

pIOL01を制限酵素BamH Iにて切断し、アガロースゲル電気泳動により13Kbの挿入断片を回収し、制限酵素BamH Iで切断したプラスミドpUC118とT4リガーゼで結合し、大腸菌JM109を形質転換して、アンピシリン耐性、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ベクターD-ガラクトピラノシド (X-gal) およびイソプロピル-ベクターD-チオ-ガラクトピラノシド (IPTG) 共存下での白色コロニー形成を指標として図1に示すプラスミドpIOL05を得た。さらに、回収した13Kb断片を制限酵素EcoR 50

Iにて切断し、6.5KbのEcoR I-A断片 (図1中の左方に示されている) を制限酵素EcoR Iで切断したプラスミドpUC118と結合し、大腸菌JM109を形質転換して、アンピシリン耐性、X-galおよびIPTG共存下での白色コロニー形成を指標としてプラスミドpIOL02を得た。

【0018】これらのプラスミドpIOL05およびpIOL02における挿入断片を大腸菌エキソヌクレアーゼIIIを用いてさらに欠失させた。すなわち、pIOL05を制限酵素Bgl IIおよびKpn Iにて、pIOL02を制限酵素BamH IおよびPst Iにてそれぞれ分解し、大腸菌エキソヌクレアーゼIIIを用いてpIOL

L05はBgIII認識部位から、pIOL02はBamHI認識部位から単一方向に欠失させてpIOL05からはpIOL05d44、pIOL05d15、pIOL05d26、pIOL05d38の各欠失プラスミドを(図1)、そしてpIOL02からはpIOL02d002の欠失プラスミドを(図2)得た。

### 【0019】実施例3

#### 形質転換体のイノシトールデヒドロゲナーゼ活性

実施例2で得た各欠失プラスミドのどれが目的のイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を有するか調べるため、これらのプラスミドを含む大腸菌組換え体のイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定した。イノシトールデヒドロゲナーゼの活性はラマレイ・アールらの方法[ラマレイ・アール, フジタ・ワイおよびフリーズ・イー, ジェイ・ビー・シー (Ramaley, R., Fujita, Y. and Freese, E., The Journal of Biological Chemistry), 254(16), 7684(1979)]を用いた。

【0020】(詳細な活性測定方法) プラスミドを含む大腸菌HB101、JM109、MV1184およびプラスミドをもたない大腸菌HB101、JM109、MV1184をLB培地(必要に応じてアンピシリンを添加)にて波長600nmの吸光度が0.8となるまで37℃で培養した(対数増殖中期)。培養液6mlから4℃, 1万回転, 10分の遠心により菌体を集めた。この菌体を5mlのPM溶液(100mMリン酸カリウム緩衝液pH6.5, 1mM MgSO<sub>4</sub>)に懸濁し、再度の遠心で菌体を洗浄した。この洗浄済み菌体に0.5mlの0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)を加えて懸濁し、60μlのリゾチーム溶液(リゾチーム1mgを0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)1mlに溶かしたものを)を添加して37℃にて20分処理した後、超\*

\* 音波式の菌体破砕機で数秒間菌体を破砕し4℃, 1万2千回転, 20分の遠心により上清を回収、酵素粗抽出液とした。

【0021】蒸留水600μl、1Mトリス塩酸緩衝液(pH9.0)100μl、5mM NAD 100μlからなる反応溶液に1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で必要に応じて希釈した100μlの酵素粗抽出液を添加し、340nmの吸光度に変化の無いことを確認した上で0.5Mのイノシトールを100μl基質として添加し、340nmの吸光度の増加速度を測定した。

【0022】(活性の定義) 第2表に示すように、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むプラスミドpIOL02、pIOL05、pIOL05d44、pIOL05d15を含有する大腸菌の粗抽出液中に高いイノシトールデヒドロゲナーゼ活性が認められた。このことからイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子はEcoRI認識部位からStuI認識部位の間の1.4Kbの間に存在することが示された。また、これらの活性は、IPTGの不存在下でも見られたがIPTGで誘導された場合にさらに高い値を示したことから、lacプロモーターおよびそれ以外の構成的なプロモーターで転写されていることが明らかになった。また、対照とした大腸菌中にはイノシトールデヒドロゲナーゼ活性は認められなかった。以上の結果から、プラスミドpIOL02、pIOL05、pIOL05d44、pIOL05d15はイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含有すること、および当該遺伝子産物であるイノシトールデヒドロゲナーゼは、大腸菌中では、lacプロモーターおよびそれ以外の構成的なプロモーターで転写されていることが明らかになった。

### 【0023】

#### 第2表

#### 大腸菌におけるイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現

| E. coli 菌株          | イノシトールデヒドロゲナーゼ活性<br>(nmol/min 蛋白質mg当たり) |       |
|---------------------|---|-------|
|                     | 培地中へのIPTGの添加                            |       |
|                     | -                                       | +     |
| JM109               | <5                                      | <5    |
| MV1184              | <5                                      | <5    |
| JM109 [pIOL02]      | 353                                     | 630   |
| JM109 [pIOL05]      | 250                                     | 516   |
| MV1184 [pIOL02d002] | <5                                      | <5    |
| MV1184 [pIOL05d44]  | 51                                      | 6040  |
| MV1184 [pIOL05d15]  | 108                                     | 12000 |
| MV1184 [pIOL05d26]  | 20                                      | 226   |
| MV1184 [pIOL05d38]  | <5                                      | <5    |



**実施例4****遺伝子産物の解析**

組換え体大腸菌内での枯草菌イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子産物を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法およびウェスタンブロット法によって解析した。ウェスタンブロット法はバーネットの方法〔バーネット、ダブリュウ・エヌ、アナリティカル・バイオケミストリー (Burnette, W. N., Anal. Biochem.), 112, 680 (1981)〕により行った。

【0024】実施例3で得た大腸菌粗抽出液、対照のバシラス・サチルス60015株（イノシトールデヒドロゲナーゼ生産菌）の粗抽出液をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により分画した。

【0025】ウェスタンブロット法により、分画されたタンパク質をニトロセルロース膜に移した後、ウサギより調製した抗イノシトールデヒドロゲナーゼ抗体と反応させた。このように、イノシトールデヒドロゲナーゼタンパク質と反応した抗体だけを、パーオキシダーゼ標識した抗ウサギIgG抗体と反応させ、イノシトールデヒドロゲナーゼのバンドだけを発色させた。図3に示すようにイノシトールで誘導されたバシラス・サチルスの粗抽出液およびIPTGで誘導されたイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む大腸菌の粗抽出液では約4キログルトン(Kd)に相当するバンドが認められたが、pIOL05d3.8を含む大腸菌の粗抽出液では抗イノシトールデヒドロゲナーゼ抗体と反応するタンパク質は認められなかった。以上の結果は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む大腸菌中では、免疫学的にも同等のタンパク質が生産されていることを示している。

**【0026】実施例5****DNA塩基配列の決定**

前記プラスミドpIOL02の約5.6Kbの挿入断片のうち、実施例3で明かとなったイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むEcoRI-SstI断片を含む約2.4KbのDNA断片について、サンガーらの方法〔サンガー・エフら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A), 74, 5463 (1977)〕によってその全塩基配列を決定した（配列表および図4-図10参照）。

【0027】決定した塩基配列は2401塩基対からなり、イノシトールデヒドロゲナーゼの全領域を含んでいる。塩基配列（図4-図10）中には、1329番目のATGから始まり、2360番目のTAAで終わる1032塩基対のイノシトールデヒドロゲナーゼに対応するオープンリーディングフレームが存在する。ATG開始コドンの9塩基対前にはGAAGGAGTのリボソームバインディングサイトが存在する。

**【0028】実施例6****アミノ酸配列**

決定されたイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列（図4-図10）から、イノシトールデヒドロゲナーゼは344アミノ酸残基からなる分子量38332ダルトンの酵素であると考えられた。この値はラマレイ・アールら〔ラマレイ・アール、フジタ・ワイおよびフリーズ・イー、ジェイ・ビー・シー (Ramaley, R., Fujita, Y. and Freese, E., The Journal of Biological Chemistry), 254 (1979), 7684 (1979)〕によるサブユニットの分子量3900ダルトンと良く一致する。

**【0029】**

【発明の効果】本発明によれば、バシラス・サチルス由来のイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む2.4KbのDNA断片の全塩基配列を決定し、当該イノシトールデヒドロゲナーゼの遺伝子構造、さらにはタンパク質構造（アミノ酸配列）が明らかになり、イノシトールデヒドロゲナーゼを、例えば、遺伝子工学的手法により改良することや、適当な宿主で大量に生産することができるようになる。

**【図面の簡単な説明】**

【図1】図1は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換えプラスミド（pIOL05）および当該組換えプラスミドより作成した、各種欠失プラスミドの制限酵素地図であり、図中、下部の太線矢印は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子をコードする領域およびその転写の方向を示す。

【図2】図2は、図1と同様、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換えプラスミド（pIOL02）およびその欠失プラスミドの制限酵素地図である。

【図3】図3は、ウェスタンブロット法による組換え体大腸菌内でのイノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子産物の解析の結果を示す図面であり、図中、Mのレーンは同時に泳動を行った分子量マーカーであり、その分子量は、上から93kd、66kd、45kd、31kdおよび22kdである。

【図4】図4は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列のうち、1-455番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【図5】図5は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列のうち、456-854番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【図6】図6は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列のうち、857-1310番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【図7】図7は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列のうち、1311-1595番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【図8】図8は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列のうち、1596-1937番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【図9】図9は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配\*

\*列のうち、1938-2279番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【図10】図10は、イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子を含むDNA断片の全塩基配列および上記塩基配列より推定されるイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列のうち、2280-2401番迄の塩基に相当する部分を示す図である。

【配列表】 配列-1

- |    |       |                   |
|----|-------|-------------------|
| 1. | 配列の種類 | c DNA             |
| 2. | 配列の名称 | イノシトールデヒドロゲナーゼ遺伝子 |
| 3. | 配列の長さ | 2401              |
| 5. | 配列    |                   |

|  |      |
|--|------|
| ATGCAATACC ATGAATCAGC CTCAATAAAC GACAATCTAC AACATTGCCA ACTATATTGA  | 60   |
| TGCCGGTTCA ATTGTGCAGC TCCGCCGGTT TATCATTATG GGTCAATTAC CTAAAGCTAT  | 120  |
| CCGATACGCA AATCGGGCTG CTCCGCCGGT TGAGGCCAAA TGCGATTCTT GCCGCTGTCTG | 180  |
| CGCGCTGCTT GCGGGGTTTC TGGCTGATAA AGTCGGACGG AAGGCTGTTT ATACCAATAG  | 240  |
| TATGCTGCTT TATGCACTAG GGATTTGTTT GGTTTTGTTT GGGGTTAATT TCCCCATGTT  | 300  |
| GTAAAGCGGT TACATCATTA TCGGTTTATC AGTAGGGGCT GACATAACCG CGTCATGGAC  | 360  |
| CATTATTGCG GAAAATGCGC CAAAGAAGAA TCGGGCCAGG CATTGCGCGT AGCACAAGTC  | 420  |
| GCITGGGCGG CCGGCGCTGT CGTTGTACTG CTCCTCTCCG TACTGGCCGG TGAATTGGGA  | 480  |
| CTCTTGGGGA ATAAATCGT ATTTGCCCAT CTGCTTGTGA TTGCGTGAT TACGTACATC    | 540  |
| CTGAGAATCA GGCTTCCGGA ATCAGACGCC TGGCAGACAA AAAATCAGCC GGAGGAAGCT  | 600  |
| CAGGCAGAGA AGCCGGCTGT ATTGAATAAG ACATCGTATT TTGATTTGCT CAAGCCTATG  | 660  |
| TATCTAAAAA GCATCCTGTT TTTGATGGGT GTGTACTTGG TTGGAACCT AGCCGCCGGG   | 720  |
| GTCATGGGCT TCTTTATGCC ATACATTAT CAGCAGGTCC GGCGGTGTAT CTGCCAATC    | 780  |
| GGCCAACCTT TTGCAATGG GGCTGTTTAT CTTACAGGA TTGGGGTTCG CCTGTGCTT     | 840  |
| CATGCCCTTT GCCGACAAAT ATAGAAAAAC CGTATTTGGA ATCGCCGCTT TCATGGCGGT  | 900  |
| GATCGGGTGG AACTGTGTTT TGCTGCCAGT TGAAGGCCTG CCGATTCTGC TCCTGTTTAT  | 960  |
| TGTCGTGATC GGCATCAATA ACGGAGCCGG GCAGCAAGCG AACTATCACT TATGGGCCAG  | 1020 |
| CGAAATCTTT CCTACGCAAT TAATTCGTTG CTTCCGCACA AGGACTGATG TTTTCTCTGT  | 1080 |
| CCGTATTTC AATAGGATTT GGAGTCTGTT TGTCCCAATG ATTATCACCA ATTTCCGCAT   | 1140 |
| TGGAACGATG GCTGCAATTC TTCTCGGATG TGTGACGGCC AGTATGATCA TCGGGCTGCT  | 1200 |
| CTTTGCGCCG AATACGCTG GCAAGTCGCT TGAACAAATT CAAGAGAAC TCTACGGGTC    | 1260 |
| TCCTCAGAGC CAAGTAAAGA AAGGAACAGA AAGCAAAATC ATGTAACCAA CAGAAGGAGT  | 1320 |
| GGCTGTCA ATG AGT TTA CGT ATT GGC GTA ATT GGA ACT GGA GCA ATC GGA   | 1370 |
| Met Ser Leu Arg Ile Gly Val Ile Gly Thr Gly Ala Ile Gly            |      |
| 1 5 10   |      |
| AAA GAA CAT ATT AAC CGT ATC ACG AAC AAG CTG TCA GGC GCG GAA ATT    | 1418 |
| Lys Glu His Ile Asn Arg Ile Thr Asn Lys Leu Ser Gly Ala Glu Ile    |      |
| 15 20 25 30  |      |
| GTA GCT GTA ACG GAT GTT AAT CAA GAA GCT GCA CAA AAG GTC GTT GAG    | 1466 |
| Val Ala Val Thr Asp Val Asn Gln Glu Ala Ala Gln Lys Val Val Glu    |      |
| 35 40 45   |      |
| CAA TAC CAA TTA AAC GCG ACG GTT TAT CCG AAT GAT GAC AGC TTG CTT    | 1514 |
| Gln Tyr Gln Leu Asn Ala Thr Val Tyr Pro Asn Asp Asp Ser Leu Leu    |      |
| 50 55 60   |      |
| GCA GAC GAA AAT GTA GAC GCT GTT TTA GTG ACA AGC TGG GGG CCT GCG    | 1562 |
| Ala Asp Glu Asn Val Asp Ala Val Leu Val Thr Ser Trp Gly Pro Ala    |      |
| 65 70 75   |      |

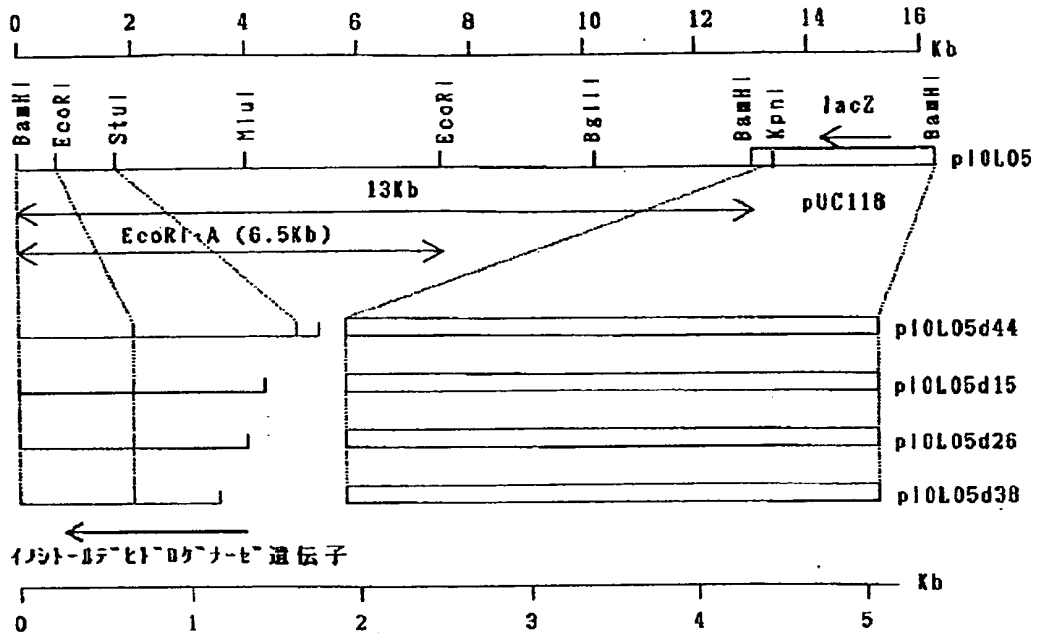
| 15  | 16   |
|---|------|
| CAT GAG TCA AGC GTG CTG AAA GCG ATT AAA GCC CAG AAA TAT GTG TTC   | 1610 |
| His Glu Ser Ser Val Leu Lys Ala Ile Lys Ala Gln Lys Tyr Val Phe   |      |
| 80 85 90  |      |
| TGT GAA AAA CCG CTC GCG ACA ACG GCT GAA GGA TGC ATG CGC ATT GTC   | 1658 |
| Cys Glu Lys Pro Leu Ala Thr Thr Ala Glu Gly Cys Met Arg Ile Val   |      |
| 95 100 105 110  |      |
| GAA GAA GAA ATC AAA GTG GGC AAA CGC CTT GTT CAA GTC GGC TTC ATG   | 1706 |
| Glu Glu Glu Ile Lys Val Gly Lys Arg Leu Val Gln Val Gly Phe Met   |      |
| 115 120 125   |      |
| CGC CGT TAT GAC AGC GGT TAC GTA CAG CTG AAA GAA GCG CTC GAT AAT   | 1754 |
| Arg Arg Tyr Asp Ser Gly Tyr Val Gln Leu Lys Glu Ala Leu Asp Asn   |      |
| 130 135 140   |      |
| CAT GTC AAC GGC GAG CCT CTT ATG ATT CAC TGC GCG CAC CGC AAC CCG   | 1802 |
| His Val Asn Gly Glu Pro Leu Met Ile His Cys Ala His Arg Asn Pro   |      |
| 145 150 155   |      |
| ACT GTA GGA GAT AAC TAT ACA ACG GAT ATG GCT GTA GTC GAC ACG CTT   | 1850 |
| Thr Val Gly Asp Asn Tyr Thr Thr Asp Met Ala Val Val Asp Thr Leu   |      |
| 160 165 170   |      |
| GTT CAT GAA ATT GAC GTG CTC CAC TGG CTC GTC AAT GAT GAC TAC GAG   | 1898 |
| Val His Glu Ile Asp Val Leu His Trp Leu Val Asn Asp Asp Tyr Glu   |      |
| 175 180 185 190   |      |
| TCC GTT CAA GTC ATC TAT CCG AAA AAA TCA AAA AAC GCG CTT CCA CAT   | 1946 |
| Ser Val Gln Val Ile Tyr Pro Lys Lys Ser Lys Asn Ala Leu Pro His   |      |
| 195 200 205   |      |
| TTA AAA GAT CCG CAA ATC GTC GTG ATT GAA ACA AAA GGC GGT ATC GTC   | 1994 |
| Leu Lys Asp Pro Gln Ile Val Val Ile Glu Thr Lys Gly Gly Ile Val   |      |
| 210 215 220   |      |
| ATC AAT GCT GAA ATC TAT GTG AAC TGT AAA TAC GGC TAT GAC ATT CAA   | 2042 |
| Ile Asn Ala Glu Ile Tyr Val Asn Cys Lys Tyr Gly Tyr Asp Ile Gln   |      |
| 225 230 235   |      |
| TGT GAA ATC GTC GGA GAA GAC GGC ATC ATC AAG CTT CCC GAG CCA TCA   | 2090 |
| Cys Glu Ile Val Gly Glu Asp Gly Ile Ile Lys Leu Pro Glu Pro Ser   |      |
| 240 245 250   |      |
| AGC ATC AGC TTG AGA AAA GAA GGC AGA TTC AGC ACT GAT ATT TTG ATG   | 2138 |
| Ser Ile Ser Leu Arg Lys Glu Gly Arg Phe Ser Thr Asp Ile Leu Met   |      |
| 255 260 265 270   |      |
| GAT TGG CAG AGA CGC TTT GTC GCT GCG TAT GAT GTG GAA ATC CAA GAC   | 2186 |
| Asp Trp Gln Arg Arg Phe Val Ala Ala Tyr Asp Val Glu Ile Gln Asp   |      |
| 275 280 285   |      |
| TTT ATT GAT TCG ATT CAA AAG AAA GGC GAG GTC AGC GGA CCG ACG GCA   | 2234 |
| Phe Ile Asp Ser Ile Gln Lys Lys Gly Glu Val Ser Gly Pro Thr Ala   |      |
| 290 295 300   |      |
| TGG GAC GGC TAT ATT GCT GCT GTC ACG ACT GAC GCG TGT GTA AAA GCC   | 2282 |
| Trp Asp Gly Tyr Ile Ala Ala Val Thr Thr Asp Ala Cys Val Lys Ala   |      |
| 305 310 315   |      |
| CAG GAA TCT GGA CAA AAA GAA AAG GTT GAA TTG AAG GAA AAA CCG GAA   | 2330 |
| Gln Glu Ser Gly Gln Lys Glu Lys Val Glu Leu Lys Glu Lys Pro Glu   |      |
| 320 325 330   |      |
| TTC TAT CAA TCT TTT ACA ACA GTT CAA AAC TAA AAAACAGAGG AGTGAAAATA | 2383 |
| Phe Tyr Gln Ser Phe Thr Thr Val Gln Asn STP                       |      |

17  
335 TGAAGTTAGC ATTGGATC 340  
2401

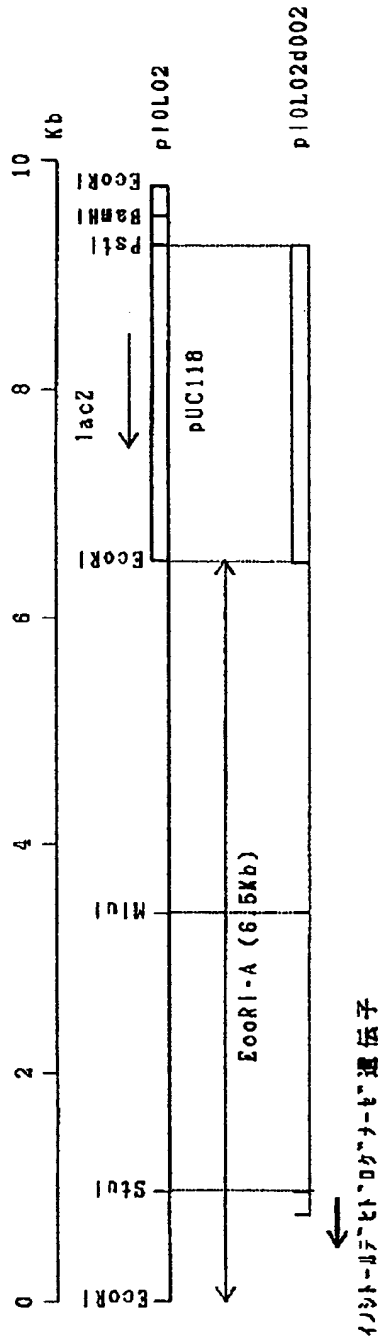
18

2401

【図1】



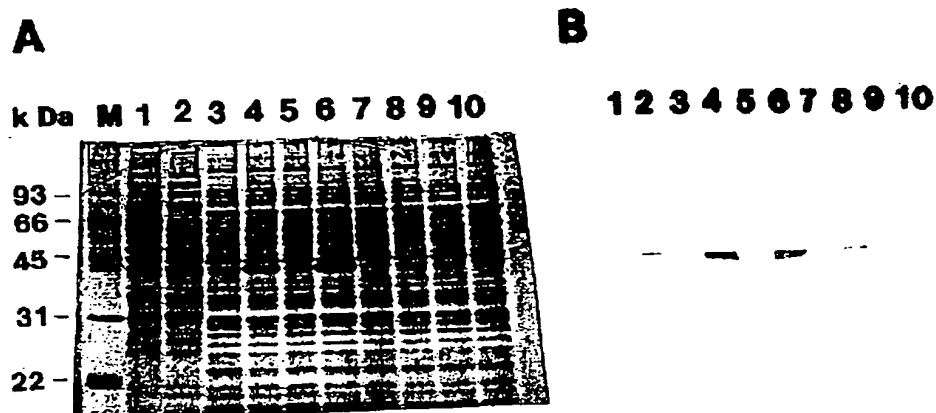
【図2】



【図4】

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AT  | GCA | ATA | CCA | TGA | ATC | AGC | CTC | AAT | AAA | CGA | CAA | TCT | AGA | ACA | TTG | CCA | ACT | ATA | 56  |
|     |     |     |     | 11  |     |     | 20  |     | 29  |     |     | 38  |     |     |     |     |     |     |     |
| TTG | ATG | CGG | GTT | CAA | TTG | TGC | AGC | TCC | GGC | GGT | TTA | TCA | TTA | TGG | GTG | AGT | TAC | CTT | 110 |
|     |     |     |     | 65  |     |     | 74  |     | 83  |     | 92  |     |     |     |     |     |     |     |     |
| AAG | CTA | TCC | GAT | ACG | CAA | ATC | GGG | CTG | CTC | CGC | GGC | TTG | AGG | CCA | AAT | GGG | ATT | TGT | 167 |
|     |     |     |     | 122 |     |     | 131 |     | 140 |     | 149 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GCC | GCT | GTC | GGG | GGC | TGC | TTG | GGG | GGT | TTG | TGG | CTG | ATA | AGG | TGG | GAC | GGG | AGG | CTG | 224 |
|     |     |     |     | 179 |     |     | 188 |     | 197 |     | 208 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TTT | ATA | GGA | ATA | GTA | TGC | TGG | TTT | ATG | CAC | TAG | GGA | TTT | GGT | TGG | TTT | TGT | TGG | GGG | 281 |
|     |     |     |     | 236 |     |     | 245 |     | 254 |     | 263 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TTA | ATT | TCC | CCA | TGT | TGT | TAA | GGG | GTT | ACA | TCA | TTA | TGG | GTT | TAT | CAG | TAG | GGG | CTG | 338 |
|     |     |     |     | 293 |     |     | 302 |     | 311 |     | 320 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ACA | TAA | CCG | CGT | CAT | GGA | CCA | TTA | TTC | CGG | AAA | ATG | CGC | CAA | AGA | AGA | ATC | GGG | CCA | 395 |
|     |     |     |     | 350 |     |     | 359 |     | 368 |     | 377 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| GGC | ATT | GGG | CGT | AGC | ACA | AGT | CGC | TTC | GGC | GGC | GGG | CGC | TGT | TGT | ACT | GCT | CCT | 452 |     |
|     |     |     |     | 407 |     |     | 416 |     | 425 |     | 434 |     |     |     |     |     |     |     |     |

【図3】



(A). SDS-電気泳動

(B)ウエスタンブロッティング

- |     |     |                                |
|-----|-----|--------------------------------|
| レーン | 1.  | バシラス・サチルス60015株(イノシトール+)       |
| レーン | 2.  | バシラス・サチルス60015株(イノシトール-)       |
| レーン | 3.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d44) (IPTG-) |
| レーン | 4.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d44) (IPTG+) |
| レーン | 5.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d15) (IPTG-) |
| レーン | 6.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d15) (IPTG+) |
| レーン | 7.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d26) (IPTG-) |
| レーン | 8.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d26) (IPTG+) |
| レーン | 9.  | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d38) (IPTG-) |
| レーン | 10. | 大腸菌MV1184株 (pIOL05d38) (IPTG+) |

【図5】

|   |     |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CTC CGT ACT GGC CGG TGA CTT GGG ACT CTT GGG GAA TAA AAT CGT ATT TGC CCA TCT | 464 | 473 | 482 | 491 | 500 | 509 |
| GCT TGT GAT TGC GCT GAT TAC GTA CAT CCT GAG AAT CAG GCT TCC GGA ATC AGA CGC | 521 | 530 | 539 | 548 | 557 | 586 |
| CTG GCA GAC AAA AAA TCA GCG GGA GGA AGC TCA GGC AGA GAA GCG GGC TGT ATT GAA | 578 | 587 | 586 | 605 | 614 | 623 |
| TAA GAC ATC GTA TTT TGA TTT GCT CAA GCG TAT GTA TCT AAA AAG CAT CCT GTT TTT | 635 | 844 | 653 | 662 | 671 | 680 |
| GAT GGG TGT GTA CTT CTT TTT GAA CTT AGC GCG GGT CAT GGG CTT CTT TAT GCG     | 692 | 701 | 710 | 719 | 728 | 737 |
| ATA CAT TTA TCA GCA GGT CCG GCG GTG TAT CTG CCA ACA TGG CCA ACC TTT TGC AAA | 749 | 758 | 767 | 776 | 785 | 794 |
| TGG GGC TGT TTA TCT TCA CAG GAT TGG GGG TCG CCT TGA TGT TCA TGC CTT TTG CCG | 806 | 815 | 824 | 833 | 842 | 851 |

→ d44

【図6】

|   |      |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|------|
| ACA AAT ATA GAA AAA CCG TAT TTG GAA TCG CCG CTT TCA TGG CCG TGA TCG GGT GGA | 863  | 872  | 881  | 890  | 899  | 908  |
| CAC TGT TTC TGC TGC CAG TTG AAG GGC TGC CGA TTC TGC TCC TGT TTA TTG TCG TGA | 920  | 929  | 938  | 947  | 956  | 965  |
| TCG GCA TCA ATA ACG GAG CCG GGC AGC AAG CGA ACT ATC AGT TAT GGG CCA CCG AAA | 977  | 986  | 995  | 1004 | 1013 | 1022 |
| TGT TTC CTA GGC AAT TAA TTC GTT GGT TGC GCA CAA GGA CTG ATG TTT TTG CTG TCC | 1034 | 1043 | 1052 | 1061 | 1070 | 1079 |
| GTA TTT CAA TAG BBA TTT GGA GTC TGT TTG TCC CAA TGA TTA TCA CCA ATT TCG GCA | 1081 | 1100 | 1109 | 1118 | 1127 | 1136 |
| TTG GAA CGA TGG CTG CAA TTC TTC TCG GAT GTG TGA CCG CCA GTA TGA TCA TCG GGC | 1148 | 1157 | 1166 | 1175 | 1184 | 1193 |
| TGC TGT TTG CCG CGA ATA COT CTG GCA AGT CCG TTG AAC AAA TTC AAG AGG AAC TCT | 1205 | 1214 | 1223 | 1232 | 1241 | 1250 |
| ACG GGT CTC CTC AGA GGC AAG TAA AGA AAG GAA CAG AAA GCA AAA TCA TGT AAG CAA | 1262 | 1271 | 1280 | 1289 | 1298 | 1307 |



【図7】

→ d26  
S D  
CAG AAG GAG TGG CTG TCA ATG AGT TTA CGT ATT GGC GTA ATT GGA ACT GGA GCA ATC  
1319 1328 1337 1346 1355 1364

Met Ser Leu Arg Ile Gly Val Ile Gly Thr Gly Ala Ile  
1376 1385 1394 1403 1412 1421

→ d38  
Gly Lys Glu His Ile Asn Arg Ile Thr Asn Lys Leu Ser Gly Ala Glu Ile Val Ala  
GGA AAA GAA CAT ATT AAC CGT ATC ACG AAG AAG CTG TCA GGC GCG GAA ATT GTA GCT  
1376 1385 1394 1403 1412 1421

Val Thr Asp Val Asn Glu Glu Ala Ala Glu Lys Val Val Glu Glu Tyr Glu Leu Asn  
GTA ACG GAT GTT AAT GAA GAA GCT GCA CAA AAG AAG GTC GTT GAG CAA TAC CAA TTA AAC  
1433 1442 1451 1460 1469 1478

Ala Thr Val Tyr Pro Asn Asp Asp Ser Leu Leu Ala Asp Glu Asn Val Asp Ala Val  
GCG ACG GTT TAT CCG AAT GAT GAC ACG TTG CTT GCA GAC GAA AAT GTA GAC GCT GTT  
1490 1499 1508 1517 1526 1535

Leu Val Thr Ser Trp Gly Pro Ala His Glu Ser Ser Val Leu Lys Ala Ile Lys Ala  
TTA GTG ACA AGC TGG GCG CCT GCG CAT GAG TCA ACG GTG CTG AAA GCG ATT AAA GCC  
1547 1556 1565 1574 1583 1592

【図8】

|     |     |      |     |      |      |     |      |      |     |      |      |     |      |      |     |      |      |     |
|-----|-----|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|
| Gln | Lys | Tyr  | Val | Phe  | Cys  | Glu | Lys  | Pro  | Leu | Ala  | Thr  | Thr | Ala  | Glu  | Gly | Cys  | Met  | Arg |
| CAO | AAA | TAT  | GTG | TTC  | TGT  | GAA | AAA  | CCG  | CTC | GGC  | ACA  | ACG | GCT  | GAA  | GGA | TGC  | ATG  | CAC |
|     |     | 1604 |     |      | 1613 |     |      | 1622 |     |      | 1631 |     |      | 1640 |     |      | 1649 |     |
| Ile | Val | Glu  | Glu | Ile  | Lys  | Val | Gly  | Lys  | Arg | Leu  | Val  | Gln | Val  | Gly  | Gly | Phe  | Met  | Arg |
| ATT | GTC | GAA  | GAA | ATC  | AAA  | GTG | GGC  | AAA  | CGC | CTT  | GTT  | CAA | GTC  | GGC  | TTC | ATG  | CAC  |     |
|     |     | 1661 |     | 1670 |      |     | 1679 |      |     | 1688 |      |     | 1697 |      |     | 1706 |      |     |
| Arg | Tyr | Asp  | Ser | Gly  | Tyr  | Val | Gln  | Leu  | Lys | Glu  | Ala  | Leu | Asp  | Asn  | His | Val  | Asn  | Gly |
| CCT | TAT | GAC  | AGC | GCT  | TAC  | GTA | CAO  | CTG  | AAA | GAA  | CCG  | CTC | GAT  | AAT  | CAT | GTC  | AAC  | AGC |
|     |     | 1718 |     | 1727 |      |     | 1736 |      |     |      | 1745 |     |      | 1754 |     |      | 1763 |     |
| Glu | Pro | Leu  | Met | Ile  | His  | Cys | Ala  | His  | Arg | Asn  | Pro  | Thr | Val  | Gly  | Asp | Asn  | Tyr  | Thr |
| SAG | CCT | CTT  | ATG | ATT  | CAC  | TGC | GGC  | CAC  | CGC | AAC  | CCG  | ACT | GTA  | GGA  | GAT | AAC  | TAT  | ACA |
|     |     | 1775 |     | 1784 |      |     | 1793 |      |     |      | 1802 |     |      | 1811 |     |      | 1820 |     |
| Thr | Asp | Met  | Ala | Val  | Val  | Asp | Thr  | Leu  | Val | His  | Glu  | Ile | Asp  | Val  | Leu | His  | Trp  | Leu |
| ACG | GAT | ATG  | GCT | GTA  | GTC  | SAC | ACG  | CTT  | GTT | CAT  | GAA  | ATT | CAC  | GTG  | CTC | CAC  | TGG  | CTC |
|     |     | 1832 |     | 1841 |      |     | 1850 |      |     |      | 1859 |     |      | 1868 |     |      | 1877 |     |
| Val | Asn | Asp  | Asp | Tyr  | Glu  | Ser | Val  | Gln  | Val | Ile  | Tyr  | Pro | Lys  | Lys  | Ser | Lys  | Asn  | Ala |
| GTC | AAT | GAT  | GAC | TAC  | GAG  | TCC | GTT  | CAA  | GTC | ATC  | TAT  | CCG | AAA  | AAA  | TCA | AAA  | AAC  | GGC |
|     |     | 1889 |     | 1898 |      |     | 1907 |      |     |      | 1916 |     |      | 1925 |     |      | 1934 |     |

[illegible]

[illegible]

(51) Int. Cl. <sup>s</sup>

(C 1 2 N 1/21

識別記号

庁内整理番号

FI

### 技術表示箇所